

棉蚜获得黄瓜花叶病毒的行为与取食过程的关系

张鹏飞, 陈建群*, 张 闲, 王 斌, 蒋群峰

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要: 利用刺吸电位 (EPG) 及其即时中断技术研究了棉蚜 *Aphis gossypii* 传播黄瓜花叶病毒 (CMV) 的机理, 分析电势落差波 (pd) 及其亚波形在棉蚜获得 CMV 的取食行为过程中的作用。结果表明: 棉蚜的获毒需要 pd 波的发生, 它的获毒效率与穿刺病株细胞膜的次数呈正相关。证明了这种行为是一种细胞内行为。对植物细胞内穿刺产生的电位落差 (pd) 波亚波形分析的结果显示, 棉蚜的获毒发生在 pd 波的 II-3 阶段, 与棉蚜主动吸食植物细胞汁液的活动相关, 这支持了蚜虫获毒的“吸入假说”。

关键词: 棉蚜; 黄瓜花叶病毒; 刺吸电位; 电位落差; 获毒

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2001) 04-0395-07

棉蚜 *Aphis gossypii* 以非持久性的传毒方式 (昆虫介体传播植物病毒的三种传毒方式之一, 因其介体在毒源植株上获毒后保持侵染力的时间短而得名, 一般只有几个小时, 甚至不到一个小时) 传播黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV), 仅几秒钟就可以完成传毒过程。通常用杀虫剂难以控制田间棉蚜传播 CMV, 这给农业生产带来了很大的危害。因此, 研究棉蚜在植物上的早期取食行为显得尤为重要。但是由于其短暂性, 使得研究困难重重。近年来, 刺吸电位 (electrical penetration graph, EPG) 技术的不断发展使得这类研究成为可能。EPG 技术 (直流系统) 由荷兰学者 Tjallingii 于 1978 年开发^[1], 它通过记录刺吸式昆虫取食时的电位变化分析昆虫的取食行为, 精度可达 10^{-2} s。根据已建立的 EPG 指标体系, 我们可研究蚜虫取食早期的行为细节与其传播植物病毒病的关系^[2]。国内在这方面的工作尚未见有报道。

确定蚜虫的获毒位置对研究非持久性病毒的传毒机理非常重要。蚜虫传播植物病毒病是通过胞内膜穿刺还是通过胞外细胞间隙的穿刺而得以实现, 过去一直存在争论^[3,4]。对于非持久性传毒方式的行为机理也一直有“口针带毒假说”^[5]和“吸入-排出假说”^[6]之争。近年来的研究表明, 蚜虫传播植物病毒病与其取食过程中口针刺破细胞膜的行为相关^[7]。Powell^[8]使用 EPG 技术初步分析了桃蚜 *Myzus persicae* 传播马铃薯 Y 病毒、甜菜花叶病毒的试探性取食行为, 发现电位落差 (potential drop, pd) 波 (蚜虫取食行为过程的早期出现的一种 EPG 波形, 是其口针刺破植物细胞膜所引起的一种电位变化) 的出现对桃蚜的成功传毒具有重要意义, 从而支持了蚜虫主要在细胞内获毒的假设。因此, 通过 EPG 即时中断技术直接研究 pd 波在棉蚜获毒过程中的作用, 将有助于揭示蚜虫传播非持久性病毒的行为机理。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870141) 和教育部优秀青年教师基金资助项目

* 通讯作者 E-mail: chenjq@nju.edu.cn

收稿日期: 2000-11-25; 接受日期: 2001-03-26

此外,已有的关于 pd 波与蚜虫传播非持久性病毒行为相关的结果,主要是建立在研究桃蚜传播马铃薯 Y 病毒组成员 (potyviruses) 基础上的^[8~10],但是,这些结果在其他类型的情况(如棉蚜传播 CMV)下是否也一样适用?如果 pd 波的出现是蚜虫获毒的必要条件,那么 pd 波中的哪一个行为细节(pd 亚波)决定了蚜虫的获毒?逐步提高蚜虫获毒时的 pd 波数目,传毒效率将如何变化?为了解决这些问题,我们选用了棉蚜-CMV 系统,并开发了先进的即时中断技术,可以人为控制蚜虫的取食行为,直接分析某一行行为细节与蚜虫获毒的关系,更加直接、明确地揭示蚜虫获毒的行为机理。因此,在我们的实验设计中,先研究与蚜虫获毒关系密切的早期取食行为细节 pd 波的发生对棉蚜获毒的影响,在确定获毒过程与 pd 波直接相关后,进一步研究 pd 波的数量及亚波形与棉蚜获毒的关系。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

实验用棉蚜为 Ag-NJCh-Cm 品系,1997 年采自南京郊区实验田泗棉 3 号上,在本实验室以香瓜 *Cucumis melo* 黄金瓜品种饲养。室内饲养环境温度 (25 ± 5)℃,光周期为 16L:8D,光照强度 3 000 ~ 4 000 lx。新生若虫饲养 1 周即用于实验。

1.2 供试植物

选用香瓜的两个不同品种:盛开花和黄金瓜。培养环境同棉蚜,种子萌发后生长至 3~4 周时用于实验。

1.3 病毒株系及病毒培养

选用 CMV 病毒株系为 CMV-RB,以 CaCl_2 冷冻干燥法保存于 -80°C 冰箱中待用。实验用源毒株的准备:用病株叶片机械接种生长 2 周左右的香瓜幼苗,1~2 周后发病的植株用作蚜传 EPG 实验的源毒株(方法见 Chen^[11])。培养环境同棉蚜。接种供试植株 2 周后观察植株发病情况,根据花叶斑判断植株是否发病。

1.4 EPG 仪器操作与即时中断技术

原理:将蚜虫及其取食的植物接入同一电路,蚜虫的口针作为电极,当口针刺破植物时电路闭合形成回路。在蚜虫取食过程中,蚜虫本身的电阻以及口针所在植物组织或细胞的电位都会发生变化。以时间为横坐标,测量电位 V_i 为纵坐标输出的波形图就是 EPG 的波形纪录。

仪器:实验用 EPG 信号放大器系荷兰华赫宁根农业大学昆虫学系研制的 Giga-8 直流放大器。输入阻抗 R_i 为 $10^9 \Omega$,输出信号经 A/D 卡(DAS-800, Metrabyte)转换后,由计算机接收并记录。数据采集软件使用本实验室编写的软件 realdisplay 1.0。

蚜虫的取食行为记录和即时中断技术:选取健壮无翅成蚜,将直径 20 μm 、长约 4~6 cm 的金丝用水溶性导电银胶粘在棉蚜的背板上,金丝的另一端接上电极,小心插入放大器的输入插头。实验开始时,将粘有金丝的棉蚜放在供试植株的叶片上。实验记录过程在屏蔽罩中进行。实验时,打开由 realdisplay 1.0 定义的热键,可将采集到的电信号即时转化显示在电脑屏幕上,我们可实时观察到回路中电信号的变化,当出现待研究波形时,迅速中断棉蚜的取食,对棉蚜的取食行为进行实时人为控制。同时,实验回路中的电信号(EPG 波形)均以数字信号形式存储于硬盘,以供分析。为确保实验中的人为干扰不损伤棉蚜口针,将中断取食

的棉蚜置于另一株植物上,继续记录 EPG 5 min,检验棉蚜是否受损伤。

1.5 pd 波的发生及数目与棉蚜获毒之间的关系

由于植物细胞膜内外电位不同,当蚜虫口针刺破细胞膜再缩回时,回路中的电位信号 V_i 先急剧下降,然后恢复原状,由此形成一个波形 pd。由于 pd 波是蚜虫穿刺植物活细胞的结果,因此我们设计了两组实验研究 pd 波发生与否以及 pd 波的数目对棉蚜获毒的影响。植物材料均选用黄金瓜。

将无毒成年棉蚜用金丝粘好后,预饥饿 1 h,然后将棉蚜放在 CMV 发病明显的黄金瓜叶片上获毒,记录 EPG 波形。一组实验是在观察棉蚜取食波形的基础上,有意识地不断干扰棉蚜的获毒行为,让它能够在植物细胞间隙穿刺 (penetration),但不能刺破 (puncture) 植物细胞的细胞膜 (即不出现 pd 波),记为 0 pd 波形 (时间总长需大于 50 s)。获毒过程中出现 pd 或其亚波形的实验记录均被作废。另一组实验根据对其获毒要求的不同分成 5 组处理,分别在出现 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个 pd 时中断获毒行为。将上述两组实验中被中断获毒的棉蚜立即转至黄金瓜健康植株上接种 3 h,2 周后记录供试植株发病结果。

1.6 pd 波亚波形与棉蚜获毒之间的关系

实验植物选用黄金瓜和盛开花两个品种。将无毒成年棉蚜用金丝粘好后,预饥饿处理 1 h,然后将棉蚜放在 CMV 发病明显的病株叶片上获毒,记录 EPG 波形。在出现第 1 个 pd 波的亚波形 II-1、II-2、II-3 时分别中断获毒行为,立即将其从病株上移至同品种健康供试植株上,接种 3 h,2 周后记录供试植株发病结果。

1.7 实验数据分析

通过已存储的数据记录,对 EPG 波形进行分析以确认与每一次记录相对应的分组处理,同时根据实验要求,将不合规范的数据作废。统计有意义的实验结果,比较不同处理间的发病率是否有显著性差异,统计方法采用 χ^2 独立性检验 (chi-square independence test)。根据上述 1.5 中的所有有效记录,进一步分析传毒成功的棉蚜与传毒不成功的棉蚜获毒过程中 pd 波数目的差异,统计方法选用 Mann-Whitney U 检验。统计分析软件为 GraphPad InStat (version 3.01, GraphPad Software Inc)。

2 结果

2.1 棉蚜的获毒相关波形——pd 波记录及其波形基本特征

pd 波一般维持 3 ~ 10 s,其频率变化不一。根据其特征又可以分为 3 个阶段:第 1 阶段 (pd I) 为植物细胞膜刚被口针穿刺,电位水平下降。第 2 阶段 (pd II) 为电位落差的持续阶段,有特异性的 pd 亚波形,可再分成 3 个阶段:pd II-1 为起始部分,频率 8 ~ 13 Hz;pd II-2 的频率更低,为 5 ~ 7 Hz;pd II-3 通常显示为有脉冲和无脉冲两种状态,其基本波形 (非脉冲部分) 频率 8 ~ 14 Hz,有脉冲波时脉冲频率为 1 ~ 2 Hz。第 3 阶段 (pd III) 为口针撤回植物细胞外,电位水平回升。其中 pd II 最为复杂,它反映了口针刺入植物细胞后蚜虫的行为细节变化。具体波形见图 1。

2.2 pd 波的出现及其数目与棉蚜获毒之间的关系

根据发病记录,统计获毒过程中获毒 0 pd 与 1 pd 的棉蚜接种供试植株的发病结果。在进

行获毒 0 pd 实验的 22 次有效记录中, 没有一株植物发病。而在获毒过程中出现一个 pd 波的 34 次有效记录中, 有 16 头棉蚜使健康黄金瓜感染了 CMV, 发病率达到 47.1% (表 1)。χ² 检验结果表明, 棉蚜的获毒与 pd 的出现直接相关 ($P < 0.001$, $\chi^2 = 16.33$)。

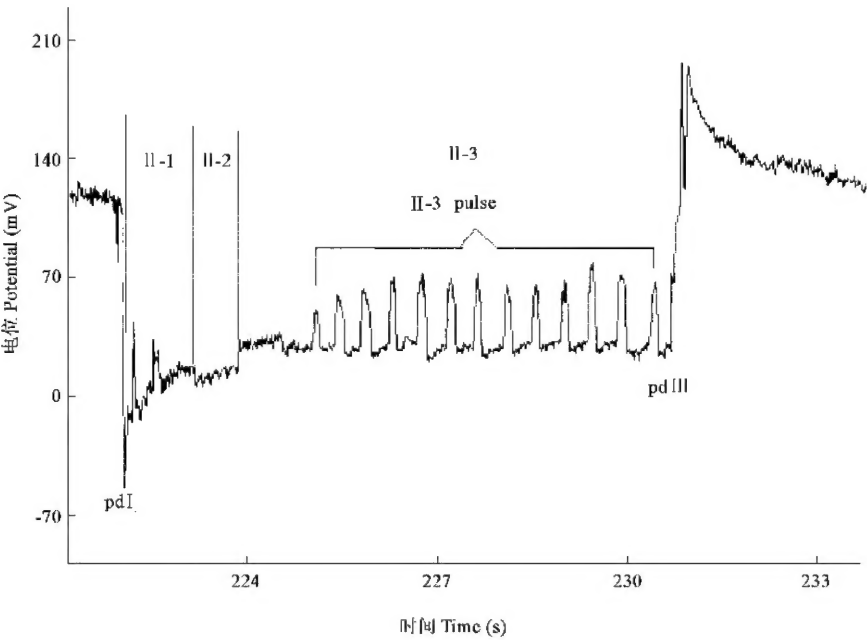


图 1 pd 波的亚波形

Fig. 1 Different sub-phases observed during the occurrence of potential drops

表 1 棉蚜获毒过程中出现不同数目 pd 时的传毒效率

Table 1 Transmission efficiency of *A. gossypii* following the CMV acquisition with different numbers of pd

pd 波数目	有效实验记录 (次)	发病植株数	发病率 (%)
Number of pd	Total experiment plants	Infected plants	Transmission rate
0	22	0	0
1	34	16	47.1
2	19	14	73.7
3	17	13	76.5
4	20	16	80.0
5	21	19	90.5

棉蚜获毒过程中 pd 波发生的数目与获毒之间的关系可通过棉蚜的传毒 (transmission) 效率得以显示: 随着获毒过程中 pd 数目的增加, 棉蚜的传毒效率不断提高, 但当 pd 数目大于 2 时, 传毒效率的增速趋缓 (表 1)。获毒过程中发生 1 个 pd 的棉蚜, 其传毒效率显著低于发生多个 pd 的棉蚜 ($P = 0.003$, $\chi^2 = 8.93$)。统计分析后者的不同处理

(2、3、4、5 pd) 与前者 (1 pd) 之间的传毒效率的差异, 其中发生 4 pd 或 5 pd 的棉蚜与 1 pd 的棉蚜之间传毒效率有显著性差异 (4 pd: $P = 0.023$, $\chi^2 = 5.17$; 5 pd: $P = 0.001$, $\chi^2 = 10.34$)。进一步统计分析所有有效记录中最终能成功传毒的棉蚜与不能成功传毒的棉蚜之间获毒过程中出现的 pd 数目的差异, 发现前者出现的 pd 数目 (3.10 个) 非常显著地高于后者 (1.54 个, $U = 746.00$, $P < 0.001$)。

2.3 pd 波亚波形与棉蚜获毒之间的关系

棉蚜在 pd 波亚波形的 3 个不同阶段中断后的传毒结果表明，在 II -3 阶段中断获毒的棉蚜传毒效率明显高于在 II -1 和 II -2 中断的棉蚜（表 2）。黄金瓜 II -1 和 II -3， $P < 0.001$ ， $\chi^2 = 17.87$ ；II -2 和 II -3， $P < 0.001$ ， $\chi^2 = 12.12$ 。盛开花 II -1 和 II -3， $P = 0.028$ ， $\chi^2 = 4.80$ ；II -2 和 II -3， $P = 0.0496$ ， $\chi^2 = 3.86$ 。因此，获毒过程中有 II -3 阶段的棉蚜，传毒效率显著高于没有 II -3 阶段的棉蚜（黄金瓜， $P < 0.001$ ；盛开花， $P = 0.013$ ）。

表 2 不同 pd 波亚波形中断棉蚜的传毒效率

Table 2 Transmission efficiency of <i>A. gossypii</i> following the CMV acquisition with different sub-phases of pd						
植物品种	pd 波亚波形	有效实验记录（次）	发病植株数	发病率（%）	χ^2 独立性检验*	
Plant variety	Sub-phase of pd	Total experiment plants	Infected plants	Transmission rate	Chi-square independence test	
黄金瓜	II -1	18	0	0	II -1 vs II -2	a
	II -2	21	2	9.5	II -1 vs II -3	c
	II -3	76	38	50.0	II -2 vs II -3	c
盛开花	II -1	13	0	0	II -1 vs II -2	a
	II -2	18	1	5.6	II -1 vs II -3	b
	II -3	31	9	29.0	II -2 vs II -3	b

* 不同处理间的差异显著性水平用不同字母表示 Different letters indicate significant difference between treatments under chi-square independence test (a. $P > 0.05$; b. $0.01 < P < 0.05$; c. $P < 0.01$)

3 讨论

蚜虫对植物表皮层细胞的几次简短的穿刺行为可获得和接种非持久性病毒，这种试探性的取食行为通常发生在植物表皮层几微米处（ $< 10\ \mu\text{m}$ ），但对蚜虫获毒的具体细胞部位一直有着不同的看法。Yoshii^[4]根据光学显微镜研究桃蚜口针鞘的轨迹，发现它们始终保持在细胞外状态，因此认为桃蚜的获毒是由于口针刺破胞间连丝而发生。López-Abella 和 Bradley^[3]用电子显微镜研究时发现，桃蚜通常在植物细胞的间隙进行穿刺，口针在寻找韧皮部的过程中会刺入细胞内，他们认为是这种行为引发了桃蚜的获毒。Powell^[8]的工作确立了 pd 波与桃蚜传毒之间的关系，认为桃蚜的获毒过程是一种细胞内行为，并成为后人研究蚜虫传播非持久性病毒行为机制的基础。但由于当时实验手段的局限性，他在很多实验条件上没有严格要求，其结果在目前看来有一定的可疑性。例如，他在预饥饿时间上没有严格控制（2~4 h），在统计口针穿刺 0 pd 状况与桃蚜获毒的关系时难以对胞间穿刺的总时间作出要求，统计有 pd 的记录时没有对 pd 的数目作出统一的规定，而这些指标对桃蚜的获毒效率有很大的影响^[8~10, 12]。因此我们直接研究在获毒过程中出现 1 pd 和不出现 pd 的棉蚜的传毒效率，并在实验中严格预饥饿 1 h，充分延长胞间穿刺时间（ $> 50\ \text{s}$ ），来研究细胞间穿刺是否能获得病毒。传毒效率的结果表明，有细胞内行为的棉蚜显著高于无细胞内行为的棉蚜（前者为 47.1%，后者为 0%， $P < 0.001$ ），并在 0 pd 获毒实验的 22 次记录中，没有一株植物发病，直接证明了棉蚜获得 CMV 是在刺破植物细胞膜后发生的。

pd 波是蚜虫在植物表皮层细胞的试探性取食时刺破细胞膜而产生的^[13]，这种对胞内信息的接触在蚜虫选择宿主植物的过程中起了重要作用。因为蚜虫的下唇和口针上并无化学感受

器, 因此需要吸入植物细胞汁液由咽部味觉器官去感受和区分^[14]。而在吸入植物汁液的过程中病毒粒子和辅蛋白同时也被吸入, 从而完成获毒过程。

我们的研究不仅显示棉蚜的获毒行为与口针刺破细胞膜有关, 而且表明膜穿刺次数越多, 获毒效率越高。我们认为这种正相关性不是由于膜穿刺次数多使棉蚜获得的病毒量大而产生更高的获毒效率, 因为蚜虫实际有效接种所需要的病毒的量是相当低的^[15]。对这种相关性, 一种合理的解释是由于病源植株上并非所有细胞都带有病毒, 因此蚜虫刺破细胞膜的次数越多, 接触到染病细胞的概率越大^[12]。我们的研究得到另一种科学的推测, 即蚜虫的获毒是与其膜穿刺过程中发生的某一个早期取食行为细节有关, 但这一细节并不是每一个 pd 波中都有; 获毒时 pd 波越多, 该行为细节出现的概率越大, 蚜虫获毒的效率也就越高。

在确定棉蚜的获毒与 pd 波密切相关的基础上, 进一步分析 pd 波的亚波形, 寻找与棉蚜获毒相关的行为细节。Powell^[9]用人工饲膜的体外系统 EPG 记录发现, 能成功获毒的桃蚜绝大多数 (25/26) 在它们的获毒记录中可观察到 II-3 脉冲, 确立了在桃蚜获毒过程中研究 pd II-3 阶段的重要性, 其他研究者也推理得到了类似的结论^[11,16]。我们直接比较获毒过程中有 II-3 阶段与没有 II-3 阶段的棉蚜的获毒效率, 发现绝大多数的棉蚜获毒都是在 II-3 阶段发生的。II-3 阶段与蚜虫食窦泵的活动有关, 代表蚜虫进入植物细胞内主动吸收植物汁液的过程^[9]。这里暗示, 蚜虫获毒行为细节可能就发生在 II-3 阶段, 这在一定程度上支持了蚜虫获毒的“吸入假说”^[17]。此外, 蚜虫获毒时的第一个 pd 波的 II-3 阶段中通常伴有一些脉冲波形, 这些脉冲波的出现与否以及它们的数目和持续时间与蚜虫的获毒行为有一定的相关性^[11,16]。但是 II-3 阶段的脉冲是否是决定蚜虫获毒的取食行为细节, 我们正在进行进一步的研究。

上述利用刺吸电位技术对蚜虫获毒过程中早期取食行为细节的研究, 初步揭示了蚜虫传播非持久性病毒的行为机理。该研究结果为我们从控制蚜虫早期取食行为的角度出发, 采取各种有效的防虫、防病措施 (如选育抗虫品种^[11], 喷油^[18]等) 来防治非持久性病毒病提供了理论依据。此外, 蚜虫刺吸电位技术的进一步完善将为我们寻找新的防治植物病虫害方法开辟新的领域。

致谢 本研究承蒙浙江大学周雪平教授赠送病毒, 谨致谢意。

参 考 文 献 (References)

- [1] Tjallingii W F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 1978, 24: 721 ~ 730
- [2] 雷 宏, 徐汝梅. EPG——一种研究植食性刺吸式昆虫刺探行为的有效方法. *昆虫知识*, 1996, 33 (2): 116 ~ 120
- [3] López-Abella D, Bradley R H E. Aphids may not acquire and transmit stylet-borne viruses while probing intercellularly. *Virology*, 1969, 39: 338 ~ 342
- [4] Yoshii H. Transmission of turnip mosaic virus by *Myzus persicae* (Sulz.): mode of stylet insertion and infection site of the virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, 1966, 32: 46 ~ 51
- [5] Kennedy J S, Day M F, Eastop V F. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. London: Commonwealth Institute of Entomology, 1962
- [6] Harris K F. An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. In: Harris K F, Maramorosch K eds. *Aphids as Virus Vectors*. 1st ed. New York: Academic Press, 1977. 165 ~ 220
- [7] López-Abella D, Bradley R H E, Harris K F. Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit nonpersistent viruses. In: Harris K F ed. *Advances in Diseases Vector Research*. vol 5. New York: Springer,

1988. 251 ~ 285
- [8] Powell G. Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyvirus. *Ann. Appl. Biol.*, 1991, 119: 313 ~ 321
- [9] Powell G, Pirone T P, Hardie J. Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and *in vitro* system that correlate with subsequent transmission. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1995, 101: 411 ~ 420
- [10] Pérez P, Tjallingii W F, Fereres A. Probing behaviors of *Myzus persicae* during transmission of potato virus Y to pepper and to bean plants. *J. Plant Disease and Protection*, 1996, 103 (2): 246 ~ 254
- [11] Chen J Q, Martin B, Rahbé Y *et al.* Early intracellular punctures by two aphid species on new isogenic melon lines with and without the virus aphid transmission (Vat) resistance gene. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1997, 103: 521 ~ 536
- [12] Collar J L, Avilla C, Fereres A. New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environ. Entomol.*, 1997, 26 (3): 537 ~ 544
- [13] Tjallingii W F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.*, 1985, 38: 187 ~ 195
- [14] Wensler R, Filshie B K. Gustatory sense organs in the food canal of aphids. *J. Morphol.*, 1969, 129: 473 ~ 492
- [15] Wang R Y, Pirone T P. Potyvirus transmission is not increased by pre-acquisition fasting of aphids reared on artificial diet. *J. Gen. Virol.*, 1996, 77: 3 145 ~ 3 148
- [16] Collar J L, Fereres A. Nonpersistent virus transmission efficiency determined by aphid probing behaviour during intracellular punctures. *Environ. Entomol.*, 1998, 27 (3): 583 ~ 591
- [17] Martin B, Collar J L, Tjallingii W F *et al.* Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 1997, 78: 2 701 ~ 2 705
- [18] 草叶敏彦, 名畑清信. 喷撒油类防治病毒病. 见: 裴维藩主编. 植物病理学译丛 (一). 北京: 中国农业出版社, 1979. 107 ~ 111

The feeding behavior and the acquisition of CMV by the cotton aphid *Aphis gossypii*

ZHANG Peng-fei, CHEN Jian-qun*, ZHANG Xian, WANG Bin, JIANG Qun-feng

(Department of Biology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The simultaneous display technique of electrical penetration graph (EPG) was used to study the effects of the wave potential drop (pd) and its sub-phases in the acquisition of cucumber mosaic virus (CMV) by the cotton aphid *Aphis gossypii* from the infected melon plants. The presence of the intracellular punctures indicated by the wave pd in EPG records is the prerequisite of the acquisition of CMV by aphids (1pd vs 0 pd: 47.1% vs 0%, $P < 0.001$). The transmission efficiency was positively correlated with the number of pd (4pd vs 1pd: 80% vs 47.1%, $P = 0.023$; 5pd vs 1pd: 90.5% vs 47.1%, $P = 0.001$). The analysis of sub-phase showed that acquisition occurred primarily during the sub-phase II-3 of intracellular punctures. This result supports the 'ingestion hypothesis' for nonpersistent virus acquisition.

Key words: *Aphis gossypii*; CMV; electrical penetration graph (EPG); potential drop (pd); virus acquisition

* Author for correspondence